

ЛЕТУЧИЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ АСКАРИД И ИХ ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ОРГАНИЗМА БЕЛЫХ КРЫС СО СЛЮНОЙ И ДРУГИМИ ПУТЯМИ

Х. Х. Алиева, А. А. Лурье, Ф. Ф. Сопрунов

Институт медицинской паразитологии и тропической медицины
им. Е. И. Марциновского Министерства здравоохранения СССР, Москва

После введения белым крысам меченных по ^{14}C летучих жирных кислот, полученных из аскарид, радиоактивные продукты обнаружены в слюне, кале и моче подопытных животных.

Летучие жирные кислоты (ЛЖК) являются конечными продуктами углеводного обмена аскарид (Weinland, 1901; Brand, 1934; Bueding, 1949). Среди этих кислот преобладают 1-метилмасляная, 2-метилмасляная, 1-метилвалериановая, метилкротоновая и другие изомеры C_5 - и C_6 -карбоновых кислот с разветвленным углеродным скелетом (Moyle, Baldwin, 1952; Bueding, 1953; Greichus, Greichus, 1966). Наличие в моче больных некоторых из этих кислот используется для биохимической диагностики аскаридоза (Сопрунова, 1968; Сопрунова, Лурье, 1972). Возможности выделения специфических метаболитов аскарид из организма хозяина другими путями (помимо мочи), которые могут представить диагностический интерес, остаются еще не изученными.

В настоящей статье представлены экспериментальные данные о появлении радиоактивных продуктов в слюне, моче и кале белых крыс после введения им ^{14}C -ЛЖК из аскарид.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Аскарид, *Ascaris suum*, собирали на бойне и доставляли в лабораторию в термосе с теплым физиологическим раствором. С момента сбора паразитов до доставки проходило не более 3 ч. 13 самок аскарид (общей массой 41.2 г), промытых в подогретой дистиллированной воде, поместили в стеклянный сосуд, содержащий 400 мл стерильной среды следующего состава (в %): NaCl — 0.8, KCl — 0.02, CaCl_2 — 0.02, MgCl_2 — 0.01, Na_2CO_3 — 0.1, глюкоза-1—6- ^{14}C с удельной активностью 4.3 мКи/г — 0.025. В этой среде в аэробных условиях и при температуре 37°C аскарид выдержали в течение 26 ч. Путем периодического добавления раствора щелочи pH среды поддерживали на уровне 8—10 (окислительно-восстановительный потенциал 150—250 мВ), что должно было привести к повышению потребления глюкозы и выделению органических кислот (Сопрунов и др., 1964).

ЛЖК из среды содержания гельминтов отгоняли с водяным паром в 0.1 М раствор NaOH в присутствии фенолфталеина. Затем путем выпаривания на водяной бане получали сухие натриевые соли ЛЖК. Состав кислот определяли методом бумажной хроматографии в виде гидроксаматов (Пушкарёв, 1965). Наличие радиоактивных ЛЖК на бумажной хроматограмме подтвердили радиоавтографированием на рентгеновской пленке, а соотношение радиоактивности различных кислот определили путем сканиро-

вания радиохроматограммы на автоматическом радиометре NR-227 (Gamma, ВНР) с торцовым коллимированным счетчиком и лентопротяжным механизмом. Суммарное молярное содержание кислот определяли экстрагированием их из водного раствора солей подкисленным диэтиловым эфиром (Whitehead e. a., 1976) и последующим титрованием 0.01 М раствором NaOH в присутствии фенолфталеина.

Меченые соли ЛЖК в количестве 215 мкмоль, растворенные в 1 мл фосфатного буферного раствора, pH 7.5, вводили внутрибрюшинно трем белым крысам массой около 100 г. Подопытных животных помещали в функциональные клетки. Кал и мочу от животных собирали отдельно через 6, 12, 24, 36 и 48 ч после введения. Пробы кала и мочи озоляли обработкой 57%-ной HClO_4 и 30%-ной H_2O_2 с нагреванием до 70–80° С (Mahin, Lofberg, 1966) и анализировали жидкостно-сцинтилляционным методом на радиоспектрометре «Mark II» («Searle Analytic Inc.», США). Использовали сцинтилляционную смесь следующего состава: толуол — 500, диоксан — 500, метилцеллозольв — 300 мл, нафталин — 130, РРО — 7.8 г (все реактивы квалификации «сцинтилляционный» или «ОСЧ»). Коррекцию гашения выполняли по методу внешнего стандарта.

Слюну от животных через 2, 4, 6, 12, 24 и 30 ч после введения ЛЖК собирали на ватные тампоны, предварительно импрегнированные 1%-ным раствором Na_2CO_3 (для предупреждения возможной потери ЛЖК путем улетучивания). Массу слюны определяли взвешиванием в полиэтиленовых пакетиках. Затем тампоны высушивали и радиометрировали в сцинтилляционной смеси ЖС-1 (4 г/л *n*-терфенила и 0.1 г/л РРОР в толуоле). В ранних экспериментах со слюной мы применяли указанную выше смесь на основе толуола, диоксана и целлозольва. Однако выяснилось, что такая смесь не пригодна для радиометрирования слюны, так как показывала устойчивое слабое свечение сцинтиллятора независимо от наличия ^{14}C . Связано это, по-видимому, с присутствием перекисных соединений в диоксане и целлозольве и каких-то компонентов слюны, способных реагировать с этими перекисями. Такие реакции нередко сопровождаются эмиссией фотонов. При использовании смесей на основе толуола (ЖС-1) или дитолилметана (ЖС-20Б) хемилюминесценция в присутствии слюны не проявлялась.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После 26-часового выдерживания 13 аскарид в аэробных условиях в среде с начальным содержанием глюкозы 0.025% было выделено ЛЖК в количестве 5.2 ммоль, т. е. 4.9 мкмоль/г ткани·ч. На бумажной хроматограмме пятна гидроксаматов, соответствующие кислотам C_1 , C_2 , C_5 и C_6 ,

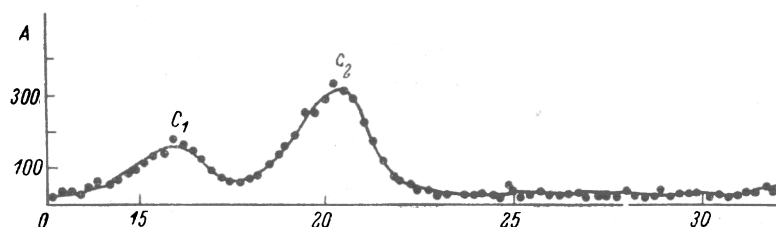


Рис. 1. Радиохроматограмма гидроксаматов ЛЖК, полученных из аскарид.

А — радиоактивность, имп/мин; X — расстояние от старта, см.

по интенсивности различались мало, но по радиоактивности (на радиоавтографах и при сканировании) пятна кислот C_5 и C_6 были заметно слабее (рис. 1). Статистическая обработка данных сканирования показала, что приблизительно 95% радиоактивности полученных ^{14}C -ЛЖК приходится на кислоты C_1 и C_2 и приблизительно 5% — на кислоты от C_3 до C_6 .

Наибольшая концентрация ^{14}C в моче во всех трех экспериментах обнаруживалась в первой порции, полученной через 6–12(24) ч после

введения ЛЖК (рис. 2). Хотя объем выделенной мочи сильно колебался у разных животных, общее количество радиоактивных продуктов, выде-

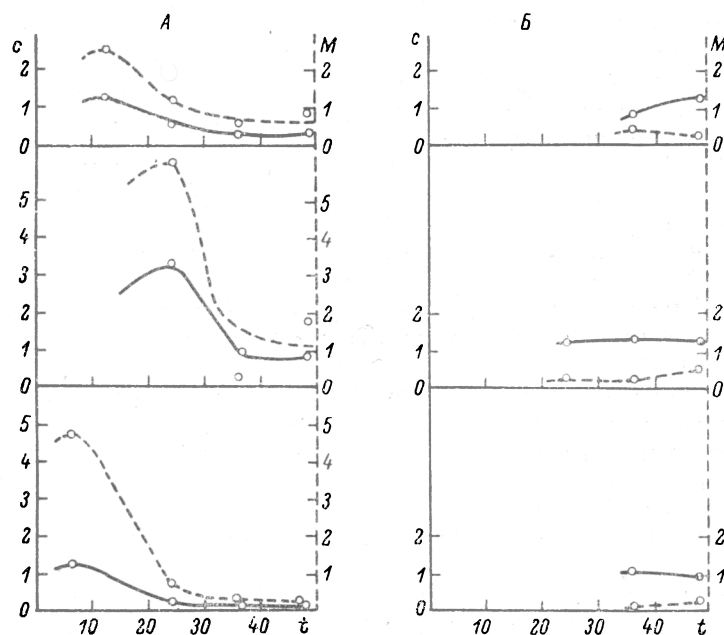


Рис. 2. Динамика выделения у белых крыс меченых ЛЖК (или их метаболитов) с мочой (А) и калом (В) по данным трех опытов.

С — концентрация, мкмоль/г; М — количество, мкмоль; t — время после введения ЛЖК, ч.

ленных с мочой в течение 2 сут, оказалось очень близким — $3.2 \pm 0.3\%$ от введенного количества ^{14}C . Содержание радиоактивных продуктов в кале на вторые сутки после введения ^{14}C -ЛЖК составляло в среднем около 1 мкмоль/г; всего за 48 ч с калом выделилось $0.3 \pm 0.2\%$ от введенного ^{14}C .

Анализ проб слюны на наличие ^{14}C (рис. 3) показал, что наибольшая

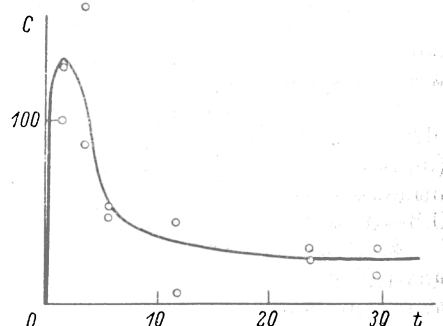


Рис. 3. Динамика содержания радиоактивных продуктов в слюне крыс.

С — концентрация, нмоль/мл; t — время после введения ^{14}C -ЛЖК, ч.

концентрация радиоактивных продуктов обнаруживается в первых пробах, через 2 ч — до 100–160 нмоль/мл; к 6 ч эта концентрация снижается до 40–50, а к 30 ч — до 20–30 нмоль/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

При аэробном содержании аскарид в углеводно-солевой среде выход ЛЖК, по литературным данным, составляет от ~ 2 ммоль на 100 г ткани за 24 ч, или 0.8 мкмоль/г ткани·ч (Erps e. a., 1950; Пушкарев, 1965), до 4 ммоль на 100 г ткани за 24 ч, или 1.7 мкмоль/г ткани·ч (Bueding, Yale, 1951), что соответственно в 6 и 3 раза меньше, чем получено в нашем эксперименте. Возможно, это связано со снижением рН и окислительно-восстановительного потенциала среды в эксперименте указанных авторов за счет того, что в среду содержания аскарид в процессе инкубирования не добавлялась щелочь.

Известно, что в аэробных условиях в составе ЛЖК, выделяемых аскаридами, наблюдается сдвиг в сторону кислот с короткой цепочкой (Erps e. a., 1950; Bueding, Yale, 1951; Bueding, 1953; Пушкарев, 1965). Последовательность выделения кислот с короткой цепочкой и их происхождение (экзо- или эндогенного характера), однако, не изучались. Наши данные показывают, что большая часть экскретированных C_5 - и C_6 -кислот произошла еще до включения экзогенной меченой глюкозы в обмен аскарид. Первыми из меченой глюкозы образовывались муравьиная и уксусная кислоты. Впрочем, возможно, что на состав ЛЖК повлияла также низкая концентрация глюкозы в среде (в нашем эксперименте концентрация была намного ниже, чем применяется обычно — 0.5%).

Отмеченные нами явления повышения концентрации ЛЖК в моче при снижении объема выделяемой мочи можно использовать в практике диагностики аскаридоза по Сопруновой (1968). Чувствительность анализа ЛЖК в моче можно увеличить, если ограничить прием воды пациентом за 6—12 ч до сдачи анализа.

Содержание радиоактивных продуктов в кале не зависело от его массы, а общее количество выводимых с калом меченых продуктов возрастало с увеличением массы выделяемого кала. Это подтверждает, что выведение с калом ЛЖК не является основным путем выведения их из организма теплокровного животного.

Обнаружение ЛЖК (или продуктов их превращения) в слюне представляет определенный интерес. Необходимо дальнейшее изучение этого явления с целью возможной разработки диагностического метода обнаружения метаболитов аскарид в слюне хозяина.

ВЫВОДЫ

1. В аэробных условиях в углеводно-солевой среде, содержащей глюкозу в концентрации 0.025%, *Ascaris suum* выделяют муравьиную и уксусную кислоты, изомеры C_5 - и C_6 -кислот и следы пропионовой и масляной кислот. В первые 26 ч радиометка из глюкозы- ^{14}C появляется в основном в муравьиной и уксусной кислотах.

2. После введения белым крысам меченых ЛЖК, выделенных из среды содержания аскарид, радиоактивные продукты обнаружены в слюне, моче и кале животных.

3. С мочой крыс в течение 48 ч выделяется $3.2 \pm 0.3\%$ от введенной дозы ЛЖК (2.15 ммоль/кг). Максимум выделения приходится на первые сутки (около 50 мкмоль/кг) и не зависит от количества мочи. Концентрация выделяемых продуктов зависит от количества мочи, колеблясь в пределах 0.3—3 мМ в течение первых 24 ч.

4. С калом крыс в течение 48 ч выделяется $0.3 \pm 0.2\%$ от введенной дозы ЛЖК. Концентрация выделяемых соединений постоянна в течение этого времени и составляет 1—2 мкмоль/г.

5. Концентрация радиоактивных продуктов в слюне максимальна в первые часы после введения животным ^{14}C -ЛЖК и составляет 100—160 мкМ. К 30 ч после введения концентрация падает до 20 мкМ.

6. Быстрое выделение конечных продуктов обмена аскарид со слюной позвоночного хозяина позволяет поставить вопрос о разработке нового биохимического диагностического теста на аскаридоз.

Литература

- Пушкарев И. А. 1965. Жирные кислоты *Ascaris suum* (состав, выделение в среду, влияние условий содержания аскарид и тормозящее действие антигельминтиков). Автореф. канд. дис. Рига: 54—63.
- Сопрунов Ф. Ф., Бенедиктов И. И., Салменкова Е. А., Григорович Ю. А. 1964. Особенности биохимического обмена аскариды свиньи (*Ascaris suum* Goeze 1872). — В кн.: Проблемы медицинской паразитологии и профилактики инфекций. М.: 472—494.
- Сопрунова Н. Я. 1968. Биохимическая диагностика аскаридоза. — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 37 (1): 76—78.

- Сопрунова Н. Я., Лурье А. А. 1972. Определение с помощью газовой хроматографии летучих жирных кислот, выделяемых гельминтами, в моче больных гельминтозами. — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 41 (2) : 137—141.
- Brand T., von. 1934. Der Stoffwechsel von *Ascaris lumbricoides* bei Oxybiose und Anoxybiose. — Z. vergl. Physiol., 21 (6) : 220—235.
- Bueding E. 1949. Metabolism of parasitic helminth. — Physiol. Rev., 29 (3) : 195—248.
- Bueding E. 1953. Formation of tiglic and n-valeric acids by bacteria-free *Ascaris lumbricoides*. — J. Biol. Chem., 202 (2) : 505—512.
- Bueding E., Yale H. W. 1951. Production of α -methylbutiric acid by bacteria-free *Ascaris lumbricoides*. — Ibid., 193 (1) : 411—423.
- Epps W., Weiner M., Bueding E. 1950. Production of steam volatile acids by bacteria-free *Ascaris lumbricoides*. — J. Infect. Dis., 87 (2) : 149—151.
- Greichus A., Greichus Y. A. 1966. Chemical composition and volatile fatty acids of male *Ascaris lumbricoides* before and after starvation. — Exp. parasitol., 19 (1) : 85—90.
- Mahin D. T., Lofberg R. T. 1966. A simplified method preparation of tritium, carbon-14, or sulfur-35 in blood or tissue by liquid scintillation counting. — Anal. Biochem., 16 (3) : 500—539.
- Moyle V., Baldwin E. 1952. Volatile fatty acids of *Ascaris lumbricoides* from the pig. — Biochem. J., 51 (4) : 504—510.
- Weinland E. O. 1901. Über Kohlenhydratzersetzung ohne Sauerstoffaufnahme bei *Ascaris*, einen trierischen Gärungsprozes. — Z. Biol., 42 (1) : 55—90.
- Whitehead J. S., Kim Y. S., Prizont R. 1976. A simple quantitative method to determine short chain fatty acid levels in biological fluids. — Clin. Chim. Acta, 72 (3) : 315—318.

VOLATILE FATTY ACIDS OF ASCARIDAE AND THEIR EXCRETION FROM WHITE RATS WITH SALIVA AND IN OTHER WAYS

Kh. Kh. Alieva, A. A. Lurje, F. F. Soprunov

SUMMARY

By maintaining Ascarids in a medium containing glucose-1-6- ^{14}C volatile fatty acids labelled with ^{14}C were obtained. These acids were administered peritoneally to white rats. The excretion of radioactive products with urine, excrements and saliva was studied.
